

[First Hit](#)[Previous Doc](#)[Next Doc](#)[Go to Doc#](#)

Generate Collection

Print

L1: Entry 4 of 9

File: DWPI

Sep 16, 1997

DERWENT-ACC-NO: 1997-473717

DERWENT-WEEK: 199819

COPYRIGHT 2006 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Use of polar and non-polar turmeric extracts - to reduce human ageing

PATENT-ASSIGNEE: ASAC PHARM INT AIE (ASACN)

Inventor: Quintanilla Almagro et al.

PRIORITY-DATA: 1996ES-0000556 (March 7, 1996), 1994ES-0001737 (August 3, 1994)

Search Selected

Search ALL

Clear

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<input type="checkbox"/> ES 2103689 A1	September 16, 1997		000	A61K035/78
<input type="checkbox"/> ES 2103689 B1	April 1, 1998		000	A61K035/78

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
ES 2103689A1	August 3, 1994	1994ES-0001737	Add to
ES 2103689A1	March 7, 1996	1996ES-0000556	
ES 2103689B1	August 3, 1994	1994ES-0001737	Div ex
ES 2103689B1	March 7, 1996	1996ES-0000556	

INT-CL (IPC): A61 K 35/78

RELATED-ACC-NO: 1996-209102

ABSTRACTED-PUB-NO: ES 2103689A

BASIC-ABSTRACT:

Extracts of Curcuma longa have found uses as reducers of high and low density oxidised lipoprotein levels, as e.g. protectors of keratinocytes from free radicals, augmenters of cellular proliferation thus protecting humous from ageing processes.

ABSTRACTED-PUB-NO: ES 2103689A

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

DERWENT-CLASS: B04

CPI-CODES: B04-A10; B14-N17; B14-R01; B14-S08;

[Previous Doc](#)

[Next Doc](#)

[Go to Doc#](#)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 103 689**

⑫ Número de solicitud: 9600556

⑤① Int. Cl.⁶: A61K 35/78

⑫

SOLICITUD DE ADICION A LA PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: 07.03.96

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: 16.09.97

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.09.97

⑥① Número de solicitud de la patente principal:
9401737

⑦① Solicitante/s:

A.S.A.C. Pharmaceutical International A.I.E.
Sagitario, 12
03006 Alicante, ES

⑦② Inventor/es: Quintanilla Almagro, Eliseo y
Díaz Alperi, Joaquín

⑦④ Agente: Ungría López, Javier

⑤④ Título: Nuevas aplicaciones de extractos apolares y polares de Curcuma longa.

⑤⑦ Resumen:

Nuevas aplicaciones de extractos apolares y polares de Curcuma longa.

Los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9 han mostrado utilidad como reductores del nivel de lipoproteínas oxidadas de alta y baja densidad, como protectores de los queratinocitos frente a los radicales libres, aumentadores de la proliferación celular, estructuradores de las queratinas de los queratinocitos de la piel, aumentadores de desmosomas, reestructuradores del citoesqueleto de los queratinocitos y, en definitiva, protectores de los procesos de envejecimiento de humanos.

ES 2 103 689 A1

DESCRIPCION

Nuevas aplicaciones de extractos apolares y polares de *Curcuma longa*.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de las aplicaciones de extractos de *Curcuma longa* obtenidos por el procedimiento de la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9.

Estado de la técnica anterior a la invención

El envejecimiento cutáneo es el conjunto de alteraciones fisiológicas en la piel unidas a los procesos de envejecimiento en general.

Es importante distinguir entre el propio envejecimiento cutáneo intrínseco o fisiológico, cuyos factores desencadenantes son: la determinación genética, las alteraciones celulares, nucleares, mitocondriales, enzimáticas, etc, y el extrínseco o actínico determinado por factores nutricionales, hormonales (menopausia), tóxicos y climáticos (radiaciones ultravioletas). En ambos casos las consecuencias son las mismas "alteraciones de las estructuras y de las funciones de la piel".

Las bases biológicas del envejecimiento, son debidas por una parte a los factores intrínsecos genéticos, en particular a los ácidos nucleicos, es conocido que "la esperanza de vida varía según la especie", aunque por otra parte, intervienen los denominados errores moleculares en la transcripción del DNA afectando intensamente a la síntesis protéica. Los defectos de la reparación del DNA inducen a una pérdida de estructuras fisiológicas donde los errores metabólicos participan de una manera específica en la desviación del programa biológico.

La teoría celular del envejecimiento cutáneo se basa en la constatación "in vitro" de Hayflick y Moorhead: los fibroblastos embrionarios humanos tienen en cultivo una vida limitada. El modelo de fibroblastos humanos nos puede dar ciertas informaciones en cuanto al envejecimiento, ya que dependiendo de la duración del cultivo la proliferación celular disminuye, existen modificaciones en las matrices extracelulares, en la forma celular y en su ultraestructura (citoesqueleto rígido, alteraciones en la reparación del DNA y anomalías cromosómicas).

Recientemente los cultivos de queratinocitos han permitido estudiar las modificaciones "in vitro" debido a factores de crecimiento en la piel procedente de donadores distintos (recién nacido, adulto joven y el anciano).

La hipótesis actual está representada por la teoría de radicales libres. Los superóxidos lipídicos y los productos de reducción del oxígeno principalmente el anión superóxido. Estos peróxidos pueden tener un origen enzimático, o ser productos fisiológicos del metabolismo celular o enzimáticos (influencias de las radiaciones ultravioletas). La acumulación progresiva de estos radicales, en parte debidos a un defecto antioxidante (superóxido dismutasa) tiene múltiples consecuencias: alteraciones de los lípidos, o de las proteínas, de membranas (citoplasmática, lisosomiales, mitocondriales), afectación de ácidos nucleicos, despolimerización de proteínas de la dermis, agregados y entrecruzamientos moleculares.

Son conocidas las alteraciones que durante el período de la vida se producen en la piel y que se resumen a continuación:

- En el tejido epitelial, por la propia fisiología intrínseca se produce una atrofia epidérmica (sobre todo del estrato de malpigio), alteraciones de los corneocitos y de los espacios intercelulares, ocasionando modificaciones en el relieve cutáneo. Por el envejecimiento cutáneo actínico o extrínseco nos encontramos con anisocitosis, alteraciones en las células basales y modificaciones en los estratos mucosos y de la capa granulosa. Estos hechos han sido puestos en evidencia por medio del estudio de la descamación de los corneocitos "in vitro" y de la tasa del índice de proliferación de la epidermis.

Estos cambios en el tejido epitelial afectan directamente a las funciones específicas de la epidermis:

- a) Alteraciones en su función de hidratación: xerosis senil, término difícil de definir en cuyas causas se involucran entre otras la falta de cohesión de los corneocitos debido a sus alteraciones morfológicas.
- b) Función barrera: modificaciones en la absorción y aumento de la penetración.
- c) Susceptibilidad a los fenómenos de irritación y de sensibilización.

d) Disminución de la producción de vitamina D, en parte debido a la disminución del contenido epidérmico en 7-dehidrocolesterol.

- 5 - En el sistema pigmentario durante el envejecimiento cutáneo se observa una disminución del número de melanocitos con reducción natural a los efectos de las radiaciones ultravioletas (UV), o una hiperpigmentación debida en parte a las alteraciones propias de los melanosomas.
- 10 - Las células de Langerhans: por el propio envejecimiento cutáneo intrínseco se encuentran disminuidas encargándose el envejecimiento extrínseco de originar las alteraciones adicionales, modificaciones en la expresión antigénica y en la producción de citoquinas (sobre todo de Interleuquina 1), hechos que influyen de manera muy importante en los procesos de fotocarcinogénesis y en la propia inmunidad local de la piel.
- 15 - Unión dermo-epidérmica estructura fundamental donde se establece el diálogo entre epidermis y dermis muestra durante la vida un progresivo aplanamiento debido a la disminución de su espesor lo que se traduce con el aumento de la fragilidad cutánea.
- 20 - La dermis y sus constituyentes: se observa una disminución del espesor de la dermis, con alteraciones de la trama vascular, trastornos en la proliferación de los fibroblastos y en la producción de matrices extracelulares, variaciones bioquímicas en el colágeno, desintegración de las microfibrillas de la dermis con depósitos de calcio y de lípidos, aumento de la sustancia amorfa en las fibras elásticas y disminución de la producción de fibronectina.
- 25 - Glándula sebácea: aumento de la talla de las glándulas con disminución de la proliferación y reducción de la producción del sebo asimismo disminución de los folículos pilosos.

Existen diferentes sistemas para realizar los estudios sobre el envejecimiento cutáneo, la simple observación clínica (aspecto de la piel, lupa); los estudios histológicos y ultraestructurales (epidermis, célula de Langerhans, melanocitos, unión dermo-epidérmica, tejido conjuntivo); estudios del relieve cutáneo (improntas); estudio del espesor cutáneo (sonografía, pliegues cutáneos); bioquímicos (biología de los diferentes sistemas); auto-radiografía; cultivos celulares (fibroblastos, queratinocitos); etc; modelos humanos de envejecimiento (Trisomia 21, Progeria, Acrogeria); estudios sobre la proliferación de los queratinocitos tras la irradiación ultravioleta.

35 El citoesqueleto es el conjunto de microtúbulos y filamentos citoplasmáticos que ayudan a la célula a mantener su arquitectura, conservar la forma celular, determinar la posición del núcleo con el resto de la célula y brindar un armazón para la fijación y organización de estructuras que producen movimientos citoplasmáticos. No obstante hay controles intracelulares capaces de influir en la forma celular y en la organización del citoplasma. Está compuesto por los microtúbulos, los microfilamentos de actina y los filamentos intermediarios. Es importante tener presente que una célula típica posee un sistema de micro-
40 filamentos, uno de microtúbulos y uno de filamentos intermediarios y no solamente uno de los tres.

Los microtúbulos guardan estrecha relación con la motilidad celular. Son pequeños cilindros de 25 a 30 nm de diámetro, tienen una estructura circular formada por subunidades, y están constituidos por proteínas asociadas con microtúbulo (MAPs). Las tubulinas, constituyentes específicos, tienen un peso
45 molecular de 55 KD. Están dispuestos como estructuras de sostén del citoesqueleto.

Los filamentos de actina forman finos haces que contactan con los tonofilamentos y con los desmosomas, mostrando la mayoría de veces filamentos denominados tradicionalmente "fibras de estrés". Estas
50 fibras discurren paralelamente a la superficie de la célula, no obstante en algunas ocasiones toman una morfología compacta situándose justo por debajo de la membrana plasmática formando los clásicos filamentos en forma de corona. La actina es capaz de fijar otras proteínas y su metabolismo está íntimamente relacionado con los iones calcio. La función primordial de los filamentos de actina es el procurar una fijación y orientación correcta de la célula cuando inicia su movimiento.

55 Los filamentos intermediarios de los queratinocitos están representados por las queratinas, que son proteínas fibrosas alfa-helicoidales que forman por autoagregación filamentos citoplasmáticos. Se sitúan entre los microfilamentos de actina y los microtúbulos. In vivo las queratinas tienen un peso molecular entre 46 y 70 KD. Durante el proceso de diferenciación las distintas capas de la piel expresan distintas queratinas, observándose progresivamente la síntesis de queratohialina y filagrina. La vimentina es
60 la representante de los filamentos intermediarios presentes en las células mesenquimatosas (fibroblastos, células endoteliales, células de la línea linfohistiocitaria, condrocitos y también de los melanocitos). Los filamentos de vimentina por su situación perinuclear sitúan el núcleo en posición correcta dentro de la

célula; guardan una estrecha relación con los microtúbulos, aunque su principal función es la del mantenimiento estático de las organelas.

La fibronectina pertenece a la familia de glicoproteínas de alto peso molecular que participan de una manera muy activa en los mecanismos que regulan las interacciones células-matriz intercelular. Existen dos tipos de fibronectina: la plasmática, sintetizada por los hepatocitos y presente en la sangre, líquido amniótico, articular, cerebral y seminal, y la celular, que se sitúa en la superficie de las células. Su característica principal es la de favorecer la adhesión por su asociación con la membrana, la regulación de la coagulación sanguínea lo que nos puede indicar la participación directa con el citoesqueleto. El colágeno, es otro de los componentes que por su morfología guarda también una estrecha relación con los filamentos intermediarios y los microtúbulos, existen distintos tipos de colágeno: tipo I y III que juntos forman pequeños paquetes de fibrillas, el tipo V, que forma copolímeros con el tipo I y el tipo IV que forma las microfibrillas y es parte fundamental de la unión dermoepidérmica. La laminina, una de las moléculas más estudiadas de la membrana basal, es un glicoproteína de 1000 KD; es sintetizada por los queratinocitos y los fibroblastos haciendo su aparición en el primer mes de vida fetal. La laminina es capaz de unirse a los receptores de superficie de las células (integrina) y de transmitir señales al citoesqueleto in vitro promueve el crecimiento de las células e interviene de manera muy especial en los mecanismos de adhesión.

Las especies químicas existentes en los rizomas de *Curcuma Longa* y por lo tanto en los diferentes extractos de éstos han mostrado una capacidad antioxidante, antirradicalaria como indica el estado de la técnica estas especies químicas curcumina, curcuminoides presentes en los extractos apolares de *Curcuma Longa* han sido utilizadas en la profilaxis y tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias así como el uso en el campo de la industria alimentaria como conservante, en todos estos casos los ensayos que realizan, los realizan in vitro y no demuestran la atoxicidad de los extractos como se indicaba para la solicitud de Patente PCT/ES95/00097, sin embargo de los trabajos recuperados por el solicitante el que más se acerca a la presente invención es el siguiente "SRINIVAS et al. Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 292, nº 2 1992" en el cual desarrolla la actividad de turmerina.

La turmerina, proteína presente en los rizomas de la *Curcuma Longa* y fácilmente aislable por extracto acuoso de estos rizomas, ha mostrado una capacidad protectora frente a los radicales libres producidos por la radiación ultravioleta en el DNA del timo de ternero así como una capacidad antioxidante en los eritrocitos humanos in vitro.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a nuevas aplicaciones de los extractos polar y apolar de *Curcuma longa* obtenidos por el procedimiento descrito en la memoria de la Patente principal nº P-9401737/9 y que esencialmente se caracteriza porque comprende las siguientes operaciones:

- (a) someter a un proceso de extracción en continuo durante unas 48 horas, los rizomas de *Curcuma* previamente cortados, secados y pulverizados, empleando un disolvente orgánico en una relación rizoma:disolvente de 1:7 peso/volumen, llevándose a cabo el proceso en régimen estacionario mediante regulación de la temperatura;
- (b) filtrar la mezcla de extracción resultante de la etapa (a) y evaporar el disolvente del filtrado obtenido a presión reducida obteniéndose como residuo seco una oleoresina marrón de olor característico;
- (c) disolver la oleoresina resultante de la etapa (b) en acetato de etilo caliente, en una proporción del 50% p/p aproximadamente y seguidamente dejar enfriar la disolución hasta la temperatura ambiente durante unas 24 horas aproximadamente, apareciendo un precipitado anaranjado que se separa por filtración;
- (d) secar a presión reducida, el filtrado procedente de la etapa anterior para obtener una segunda oleoresina más oscura que la anterior, cuyo contenido en curcuminoides oscila entre 20 y 25%;
- recristalizar el precipitado resultante en acetato de etilo al 50% (p/p) aproximadamente, para obtener un sólido con una pureza en curcuminoides superior al 90%;

y porque (II) para la obtención del extracto polar de *Curcuma longa* se efectúan las siguientes operaciones:

- (a) someter a un proceso de extracción con agua los rizomas de *Curcuma longa*, previamente cortados, secados y pulverizados, manteniéndolos en maceración durante unas 24 horas a una temperatura comprendida entre 50 y 70°C;

(b') filtrar la mezcla de extracción resultante de la etapa (a) y evaporar el agua del filtrado así obtenido a presión reducida, para obtener un residuo que es un sólido higroscópico correspondiente al extracto polar de *Curcuma longa*;

5 y porque (III) también es posible llevar a cabo las extracciones mediante la técnica de extracción supercrítica empleando una corriente de CO₂ conteniendo aproximadamente un 5% de etanol y a una presión de aproximadamente 260 bar para obtener el correspondiente extracto apolar con una pureza en curcuminoides del 90%; o empleando agua como codisolvente en las mismas condiciones para obtener el extracto polar.

10 Por la importancia que tiene el citoesqueleto dentro de la fisiología normal de la célula, la presente invención desarrolla el efecto de los extractos de *Curcuma longa* sobre la proliferación celular, el citoesqueleto (los microtúbulos, los microfilamentos de actina y los filamentos intermediarios) la expresión de fibronectina, laminina y colágeno en cultivos de queratinocitos, melanocitos y fibroblastos procedentes de donantes de distintas edades y en sucesivos pasajes, así como sobre el efecto sobre la proliferación de los queratinocitos tras la irradiación con luz ultravioleta A/B como indicadores de capacidad protectora de los extractos de *Curcuma longa*.

Por otra parte los radicales libres de oxígeno probablemente no juegan un papel importante no solo en el proceso de envejecimiento sino también en algunos síndromes degenerativos ligados a dicho proceso. Especialmente, está ganando aceptación la idea de que la aterogénesis (que da lugar a la arterioesclerosis y otros procesos cardiovasculares) deriva de la acción de los peróxidos lipídicos formados en la sangre que lesionan el endotelio y provocan un proceso inflamatorio en la pared arterial. Este resultado está de acuerdo con las investigaciones que demuestran una acumulación de peróxidos lipídicos en las placas arterioscleróticas, de intensidad paralela a la del proceso de degeneración vascular. Este concepto está de acuerdo con los datos que muestran una elevación de los niveles sanguíneos de peróxidos lipídicos en el plasma de pacientes que se recuperan de infarto de miocardio o angina de pecho y de sujetos con otros factores de riesgo ateroesclerótico, como tabaquismo, estrés, hipertensión distólica y edad avanzada. Estos datos sugieren una vez más que los peróxidos lipídicos están relacionados con la patogénesis de la arteriosclerosis. Los mecanismos serían:

- a) alteración de las lipoproteínas-lipasas de la pared de los vasos coronarios, con los consiguientes cambios en el metabolismo del colesterol y de los triglicéridos,
- b) formación de trombos, a causa de una inhibición de la síntesis de prostaciclina,
- c) oxidación de las lipoproteínas plasmáticas especialmente las de baja densidad,

La oxidación de las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad parece ser de gran importancia para la patogenia de la aterosclerosis, puesto que las LDL oxidadas tienen una mayor carga que las LDL nativas y por lo tanto inducen a una acumulación de éster de colesterol en los monocitos y macrófagos humanos, aumentando así el potencial aterogénico de estas células.

La presente invención desarrolla una nueva aplicación de los extractos de *Curcuma longa*, como modulador de las lipoproteínas de alta y baja densidad oxidadas (HLD y LDL).

La diferencia fundamental entre la presente invención y el trabajo de Srinivas (1992) mencionado anteriormente radica en el sustrato de estudio.

La presente invención demuestra experimentalmente la capacidad protectora del extracto acuoso de *Curcuma longa* en el tejido cutáneo, la primera defensa del organismo frente a las agresiones externas como los radicales libres.

Se demuestra por los estudios que se indican más adelante que no se puede correlacionar la capacidad antioxidante de los extractos con la capacidad protectora del extracto en las células humanas, ya que los curcuminoides poseen un conocido carácter antioxidante y captador de radicales libres, sin embargo no tienen un efecto protector de los queratinocitos como posee el extracto acuoso de *Curcuma longa*.

Se ha demostrado la actividad protectora del extracto acuoso de *Curcuma longa* utilizando un modelo de proliferación celular y un modelo morfológico en humanos mucho más representativo que los ensayos de capacidad antioxidante in vitro o en animales.

Se demuestra la capacidad reductora de los niveles de lipoproteínas de alta y baja densidad oxidadas HDL y LDL, esto aporta un dato más en aplicación de los extractos de *Curcuma longa* como agente

preventivo de la arteriosclerosis, como se citaba en la solicitud de Patente PCT/ES95/0097.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Es una gráfica representativa de los niveles de peróxido de LDL.

Figura 2.- Es una gráfica representativa de los niveles de peróxidos de HDL.

Modos de realización de la invención

La presente invención se justifica experimentalmente con los siguientes estudios y análisis efectuados a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la presente invención.

1.- Efecto de distintos extractos de *Curcuma longa* sobre la proliferación de los queratinocitos humanos tras la radiación ultravioleta A/B

1.1.- Extractos utilizados

Los extractos utilizados en el presente estudio se obtuvieron por extracción por maceración de los rizomas triturados de *Curcuma longa* durante 24 horas, posterior eliminación del disolvente a presión reducida y a 50°C, posteriormente las muestras fueron liofilizadas. La relación utilizada de rizoma/disolvente fue de 1/10. En los diferentes extractos se determinó el contenido de curcuminoides y de nitrógeno protéico por el método Pierce, a continuación se detallan los diferentes extractos.

Extracto	Disolvente	% Curcuminoides	Proteínas
1	Etanol	23 %	0 %
2	Etanol/Agua (1/1)	8 %	21 %
3	Agua	0 %	31 %
4*	Etanol-agua	11 %	16 %
5*	Agua-etanol	13 %	20 %

* Se extrae primeramente con el primer disolvente y el residuo se vuelve a extraer con el segundo disolvente indicado.

1.2.- Cultivos celulares

Se han utilizado en este estudio la línea de queratinocitos humanos normales denominada HaCat (Human adult low Calcium high Temperature) que fue cedida al solicitante gentilmente por el Prof. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Esta línea tiene un potencial de diferenciación exactamente igual que los queratinocitos normales.

Las células han sido cultivadas en medio de Hanks con un 5 % de suero bovino fetal y un 1 % de penicilina/estreptomicina y se mantuvieron en una estufa a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5 %.

El medio de cultivo se cambiaba dos veces por semana. El control de crecimiento se realizaba mediante un microscopio invertido.

1.3.- Proliferación celular

Para medir la proliferación celular se ha incorporado a los cultivos de 5-bromo-2-desoxyuridina (BrdU) (Cell Proliferation ELISA-Kit, Boehringer, Mannheim). Para esta técnica se incorporaron de 5 a 7 x 10³ células/pocillo en una multiplaca; tras 24 horas se le añadieron al medio distintas concentraciones de extractos de *Curcuma longa* (0, 1, 5, 10, 50 y 100 mg/ml). Las células fueron irradiadas con UVA/B; tras la irradiación se lavaron las placas con PBS y se incorporó la BrdU que fue medida en un espectrofómeto con un filtro de 450 nm.

1.4.- Radiación Ultravioleta

Las células fueron irradiadas con una lámpara Psorilux 3050 A-Lampe (original Hanau, Hanau Germany) con diferentes dosis: 50, 100 y 200 mJ/cm². La lámpara no emite ningún espectro significativo de UVC.

1.5.- Resultados

Las células se incubaron con los 5 extractos distintos de *Curcuma longa*, estas células se irradiaron con distintas intensidades de UVA/B, posteriormente se midió la proliferación celular.

Células control (medio sin extracto)

Las células en un medio sin extracto reaccionaron a la irradiación con UV con una disminución del grado de proliferación dosis dependiente.

Extracto 1

Las células señalaban un estado sin irradiar en cultivos controles una inhibición de la proliferación celular a la concentración de 50 mg/ml, teniendo en cuenta lo anterior, a 100 µg/ml no existía ninguna proliferación celular. Después de la irradiación con UVA-B reaccionaron las células al extracto más sensiblemente, por lo que la inhibición de la proliferación de las células ya se presentaba a concentraciones inferiores del extracto a partir de 5 mg/ml. Con una intensidad de irradiación de 100-200 mJ la inhibición de la proliferación de las células fue más intensa.

Extracto 2

En células no irradiadas mostraba una inhibición de la proliferación a partir de 50 mg/ml, también se pudo observar una reacción más intensa en las células después de la irradiación. Ya a partir de una concentración de 5 mg/ml de medio se observaba esta inhibición, con intensidades de irradiación de 100-200 mJ la inhibición fue más fuerte.

Extracto 3

Este extracto no mostró ninguna reacción sobre la proliferación de las células. La DNA sintetasa fue la misma en todas las concentraciones utilizadas. Tampoco las radiaciones UV pudieron sensibilizar las células para este extracto. Así que después de irradiarlas no se pudo observar cambios en la proliferación celular.

Extracto 4

También aquí se vio una disminución de la proliferación celular a partir de 50 mg/ml en células no irradiadas. Después de irradiarlas mostraban una reacción más fuerte a la disminución de la proliferación.

Extracto 5

Señaló una inhibición más significativa a partir de la concentración de 5 mg/ml en células no irradiadas, pero después de irradiarlas señaló la misma sensibilidad que los extractos 1, 2 y 4. Las células ya reaccionaban a partir de una concentración menor de 5 mg/ml con una disminución de la proliferación.

1.6.- Conclusiones

El extracto acuoso de *Curcuma longa*, demuestra in vitro en queratinocitos humanos una acción protectora frente a los radicales libres generados por la radiación ultravioleta a todas las concentraciones y a todas las dosis.

Por lo que la actividad antiradicalaria en los queratinocitos humanos no está en los curcuminoides sino en la fracción proteica del extracto.

*2.- Efectos del extracto acuoso de Curcuma longa sobre el citoesqueleto de los queratinocitos humanos in vitro**2.1.- Obtención de la piel*

Se utiliza piel sana procedente de pacientes operados en los Servicios Quirúrgicos de Cirugía Plástica, Dermatología, Urología y Ginecología. La relación es la siguiente:

Tipo de operación	Edad media	Casos
Legrado. Piel fetal	18 semanas	4
Circuncisión	3 años	12
Reducción mamaria	31 años	7
Abdominoplastia	53 años	9
Biopsias de piel	73 años	14

2.2.- Cultivos de queratinocitos

La piel es transportada hasta el laboratorio en condiciones estériles, sumergida en líquido de Hank's (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Seromed) y 1% de penicilina estreptomycin (Gibco).

Se realizaron varios lavados con solución tamponada de fosfatos, se somete la piel a la acción de la tripsina (concentración 0.25%, Boehringer. Mannheim), durante dos horas a 37°C o a

la acción de la Dispase II (solo en piel fetal) (Boehringer Mannheim) durante toda la noche a 4°C.

Tras este período se realiza la separación dermo-epidérmica y una vez obtenida la suspensión celular de queratinocitos, éstos, se introducen en frascos de cultivo de 25 cm² (NUNC) con el medio adecuado para queratinocitos.

2.3.- Medios de cultivo

- Keratinocyte-SFM Basal medium (Gibco)
- Bovine Pituitary Extract (50 µg/ml. Gibco)
- Recombinant Epidermal Growth factor (5 ng/ml. Gibco).
- 1 % Penicilina/Estreptomina (Gibco)

El medio se cambia tres veces por semana. Tras 15 días de cultivo se realiza el primer pasaje utilizando concentraciones muy bajas de tripsina y EDTA (0,025/0,01 %) respectivamente.

2.4.- Incorporación del Extracto

Se introducen en frascos de cultivo de células confluyentes procedentes de piel de pacientes de 3 años de edad y de 68-80 años una concentración de 5 mg/ml de extracto acuoso de Curcuma longa. Estos cultivos permanecen con el extracto 48 horas tras las cuales se cambia el medio y se vuelve a añadir el extracto fresco.

A los cuatro días de contacto con el extracto acuoso de Curcuma longa se efectúa el estudio del citoesqueleto.

2.5.- Estudio del citoesqueleto

2.5.1.- Anticuerpos utilizados

2.5.1.1.- Queratinocitos

- Phalloidin, TRITC, Actina (dilución 1/10) (Merck)
- Anti-tubulin (dilución 1/20) (sera-lab)
- KL 1-anti-keratinocytes of basal layer (dilución 1/20) (Immunotech)
- Human keratin (dilución 1/50) (Sanbio)
- Monoclonal mouse-anti-laminin (dilución 1/20) (Sigma)
- Anti-human Fibrinectin (dilución 1/50) (Sigma)
- Anti-human Desoplaquina (dilución 1/20) (Sigma)

2.5.2.- Técnicas para el uso de anticuerpos

2.5.2.1. - Fijación especial para los anticuerpos utilizados

- Actina: Formaldehído, 25 minutos a temperatura ambiente.
- Tubulina: metanol, 10 minutos a -20°C
- KLI, Pan-queratinas, desmoplaquina: acetona /metanol, 10 minutos a 4°C.
- Fibronectina: acetona, 20 minutos a -20°C.

2.5.2.2. - Inmunofluorescencia indirecta

Tras la fijación las células son lavadas en solución tamponada de fosfatos (PBS) (Flow. Lab) adicionando 1 % de BSA. Posteriormente se cubren con el anticuerpo a estudiar y se incuban durante 2 horas a 37°C. Se realizan varios lavados con PBS y se añade el conjugado marcado con fluorescencia o rodamina diluido en PBS+1 % de suero bovino fetal.

2.5.2.3. - Sincronización de las células y estudio de proliferación celular mediante la incorporación de BrdU

Antes de realizar el estudio de la proliferación mediante la incorporación de la BrdU, las células fueron sincronizadas con el siguiente protocolo:

Durante tres días las células fueron cultivadas con los medios adecuados, pero en todos los cultivos de la invención tanto de queratinocitos, fibroblastos o melanocitos se adiciona solo un 0,4 % de suero bovino fetal, al día siguiente las células se mantuvieron con medio completo y ya se incorporó la BrdU.

Se incorporaron en los cultivos la BrU (concentración 10 µM) durante 30 minutos para los queratinocitos y fibroblastos y durante 2 horas en los cultivos de melanocitos. Se lavan las células con PBS +1 % glucosa y se realiza la fijación mediante etanol 70 % en PBS durante 30 minutos a 0°C. Posteriormente para desnaturalizar el DNA se tratan las células durante 30 minutos con 2N HCl a temperatura ambiente siendo rápidamente bloqueado el efecto del HCl mediante tetraborato de sodio (0,1 M, pH 8.5). Las células se incuban durante 30 minutos con anti-BrdU (dilución 1/10 en PBS

ES 2 103 689 A1

+0,5% Tween 20+10% BSA). Después de varios lavados se revelan con goat-anti-mouse IgG (FITC) (dilución 1/20). Realizamos el recuento de células BrU positivas cuya interpretación se da en %.

2.6.- Resultados

2.6.1.- Cultivo de queratinocitos

2.6.1.1.- Tiempo de confluencia y número de pasajes

Edad	Cultivo	número primario pasajes	signos de diferenciación
fetales (4 semanas)	10 días	4*	a partir del 3er pasaje
neonotal (30 días)	10 días	4*	a partir del 3er pasaje
4-9 años	13 días	3	a partir del 3er pasaje
18-31 años	17 días	3	a partir del 2º pasaje
45-60 años	19 días	2	a partir del 2º pasaje
80 años	21 días	1**	a partir del 1er pasaje

* p=0,05

** p=0,01

2.6.1.3.- Estudio del citoesqueleto

Edad	neonatales	60-70 años	60-70 años+ Cúrcuma
C.P	+++	+	+++
Actina			
U.P	+++	+	+++
C.P	+++	++	+++
Tubulina			
U.P	++	-	++
C.P	++	++	+++
Quer.basal			
U.P.	+	-	+
C.P.	++	++	+++
Quer.Total			
U.P.	++	+	+++
C.P.	-	+++	+
Quer.1-10			
U.P.	-	++	-
C.P.	+++	+	+++
fibronectina			
U.P.	+	-	+
C.P.	+++	+	+++
desmoplaqui.			
U.P.	+++	-	++
BrdU	80%	20%	65%

+ marcaje débil

++ marcaje moderado

+++ marcaje intenso

* p= 0.001

C.P. = Cultivo Primario

U.P. = Último Pasaje

Los microfilamentos de actina están presentes en todos los cultivos realizados si bien su expresión es menos intensa en los queratinocitos embrionarios y en los adultos (mayores de 80 años). El patrón de distribución no fue exactamente igual ya que en los queratinocitos embrionarios exhibían la actina con la morfología típica de filamentos de estrés, esta disposición de la actina fue constante y de marcaje mas intenso en los queratinocitos hasta 31 años, posteriormente los queratinocitos más adultos presentaban los microfilamentos justo debajo de la membrana citoplasmática perdiendo la estriación típica.

Los microtúbulos demostraron en los cultivos embrionarios y de adultos jóvenes un intenso marcaje de los mismos y fue típico observar múltiples formaciones de husos mitóticos en las células a veces de manera anormal ya que estos husos se formaban por la unión de otras células. En los cultivos adultos observamos una disposición correcta de microtúbulos acumulándose especialmente debajo de la membrana citoplasmática igual que los filamentos de actina y encontrando pocas formaciones en huso.

La queratina de 56.5KD (queratina basal, KL1), solo estuvo presente en los cultivos primarios y con moderada intensidad en los queratinocitos embrionarios y procedentes de piel de niño; esta queratina mostró un patrón citoplasmático compacto. En los últimos pasajes no se observó la presencia de queratina basal en los cultivos de queratinocitos adultos. Las queratinas totales siempre estuvieron presentes tanto en cultivo primario como en los últimos pasajes, el patrón de esta queratina no fue compacto, se distribuye de forma fibrilar por todo el citoplasma de la célula estableciendo conexiones con los desmosomas. La queratina 1-10 representante de los filamentos intermediarios diferenciados fue totalmente negativa en los cultivos primarios procedentes de piel fetal y de niño, no obstante en los últimos pasajes se evidenció de una manera débil, mientras que en los adultos el marcaje de esta queratina fue muy intenso, mostrando largos filamentos de disposición paralela en el citoplasma.

La laminina estuvo presente ya en los cultivos primarios aunque mostrando un marcaje débil, solo en los últimos pasajes los queratinocitos neonatales y embrionarios contenían pequeñas fibrillas. La fibronectina fue intensamente positiva en los cultivos primarios jóvenes formando paquetes de microfibrillas en la periferia del citoplasma, negativizándose prácticamente en los últimos pasajes.

Con el estudio de la desmoplaquina se pudo observar solo un marcaje intenso en los queratinocitos jóvenes. Tras los sucesivos pasajes los queratinocitos adultos mostraban solo un débil marcaje.

El estudio de la proliferación mediante la incorporación de la BrdU demostró que existe una diferencia significativa entre los cultivos de células embrionarias y las de adultos de 80 años, mientras que los demás mostraron ciertas oscilaciones no siendo los estudios estadísticos significativos.

Cuando se añade el extracto acuoso de *Curcuma longa* a los cultivos se observa lo siguiente:

- Existe una reestructuración del citoesqueleto que se evidencia por la aparición de imagen en mosaico o en empedrado de los queratinocitos procedentes de piel de más de 60 años de edad cuando en realidad en los controles esta morfología solo permanecía en cultivos hasta los 20 años.
- En los cultivos de células procedentes de prepucios de 3 años existía una expresión intensa de las queratinas de proliferación, este hecho desaparece a medida que el cultivo procede de células adultas; al añadir *Curcuma longa* la expresión de esta queratina reaparece nuevamente en queratinocitos adultos, igual ocurría con el anticuerpo anti-panqueratina y anti-tubulina.
- La expresión de la desmoplaquina y la fibronectina fue muy fuerte cuando en los cultivos procedentes de piel adulta se añade el extracto acuoso de *Curcuma longa*.
- La actina presentaba la imagen típica de filamentos de estrés en todos los cultivos de células adultas adicionados con extracto acuoso de *Curcuma longa*.

2.7.- Conclusiones

El extracto acuoso de *Curcuma longa* aumenta la proliferación celular en cultivos de tejidos humanos envejecidos.

El extracto acuoso de *Curcuma longa* produce una estructuración fisiológica en las queratinas de los queratinocitos de la piel en cultivos de tejidos humanos envejecidos.

El extracto acuoso produce un aumento de los desmosomas en cultivos envejecidos comparable a los resultados "in vivo".

El extracto acuoso de *Curcuma longa* reestructura el citoesqueleto queratinocitos humanos en cultivo procedentes de piel adulta y de distintos pasajes.

El extracto acuoso de *Curcuma longa* posee capacidad protectora contra los procesos de envejecimiento.

3.- *Efecto de los comprimidos de extractos de Curcuma en las lipoproteínas oxidadas.*

Se han administrado oralmente comprimidos de extracto de *Curcuma longa* cuya composición es la siguiente:

	mg/comprimido
Extracto apolar de <i>Curcuma Longa</i> *	60
Extracto polar de <i>Curcuma Longa</i> **	175
Excipientes csp	

* Equivalente a 12,5 mg de Curcuminoides

** Equivalente a 50 mg de proteínas

dos veces al día a 20 voluntarios sanos (10 hombres y 10 mujeres) con edades comprendidas entre 40 y 72 años (media: 55,7 años, desviación estandar: 9,1 años).

A los voluntarios se les extrajo sangre al inicio del tratamiento, a los 30 días y a los 60 días.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena cubital, y usadas para una evaluación citológica de rutina (usando un analizador Technician H1), llevándose a cabo los análisis de los parámetros bioquímicos a cabo usando los reactivos y métodos estándares de Boehringer Mannheim (usando un autoanalizer Hitachi 717). Además se realizó una evaluación citoquímica del hígado (determinando los niveles plasmáticos de la gamma glutamin transferasa [GGT], glutámico oxalacético transferasa [GOT], glutámico pirúvico transferasa [GPT], fosfatasa alcalina y bilirrubina) y de la función renal (evaluando los niveles plasmáticos de urea y creatinina) y una determinación de los niveles de peróxidos de lipoproteínas siguiendo el método del ácido tiobarbitúrico. Así se determinó también la tasa de colesterol.

3.1.- *Resultados y discusión*

El tratamiento fue bien tolerado, y ninguno de los individuos tuvo que dejar el estudio a causa de algún efecto secundario. Por lo que respecta a los resultados de los análisis sanguíneos no se muestran variaciones significativas en los recuentos celulares o en los parámetros bioquímicos estándares. Además, el hecho de que los niveles de los enzimas hepáticos tampoco variaran sugiere que el tratamiento no es hepatotóxico.

La tasa de colesterol no sufrió variaciones estadísticamente significativas por tanto los hombres como las mujeres participantes en el estudio presentaron una disminución en los niveles de HDL y LDL peroxidado a los 30 días del tratamiento, siendo ésta más generalizada al cabo de los 60 días, cayendo los valores finales de peroxidación entre un 20 y un 50 % del valor inicial. Resulta interesante remarcar que los valores no cayeron hasta un nivel cero, sino que se alcanzaron valores análogos a los de los individuos con bajo nivel de peroxidación, quienes por otra parte, no reflejaron variaciones importantes.

3.2.- *Conclusiones*

El extracto de *Curcuma longa* reduce el nivel de las lipoproteínas oxidadas de baja y alta densidad hasta un valor umbral análogo a los individuos con un bajo nivel de peroxidación.

REIVINDICACIONES

1. Aplicación de los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9, en la fabricación de composiciones y preparados para reducir el nivel de las lipoproteínas oxidadas de baja y alta densidad hasta un valor umbral análogo a los individuos con un bajo nivel de peroxidación.
2. Aplicación de los extractos de Curcuma longa, según la reivindicación 1, en la fabricación de composiciones y preparados moduladores de las lipoproteínas de alta y baja densidad oxidadas (HLD y LDL).
3. Aplicación de los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9, en la fabricación de composiciones y preparados para la protección in vitro de los queratinocitos frente a los radicales libres generados por la radiación ultravioleta.
4. Aplicación de los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9, para la fabricación de composiciones y preparados para aumentar la proliferación celular en cultivos de tejidos humanos envejecidos.
5. Aplicación de los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9, para la fabricación de composiciones y preparados para estructurar fisiológicamente las queratinas de los queratinocitos de la piel en cultivos de tejidos humanos envejecidos.
6. Aplicación de los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9, para la fabricación de composiciones y preparados para aumentar los desmosomas en cultivos envejecidos.
7. Aplicación de los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9, para la fabricación de composiciones y preparados para reestructurar el citoesqueleto de queratinocitos humanos en cultivo procedentes de piel adulta.
8. Aplicación de los extractos de Curcuma longa obtenidos por el procedimiento descrito en la solicitud de Patente principal nº P-9401737/9, para la fabricación de composiciones y preparados para proteger a los humanos frente a los procesos de envejecimiento.

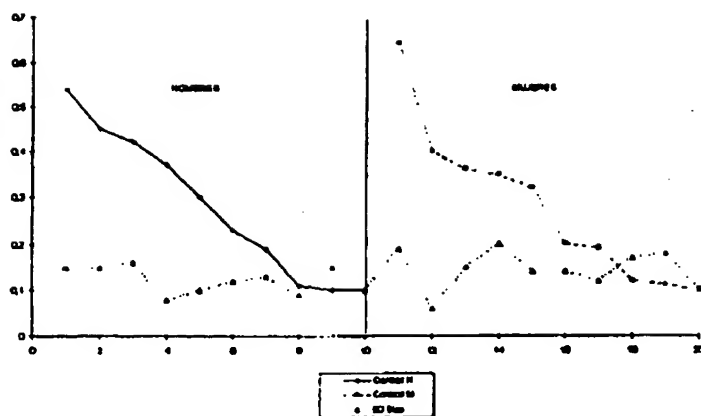


FIGURA 1

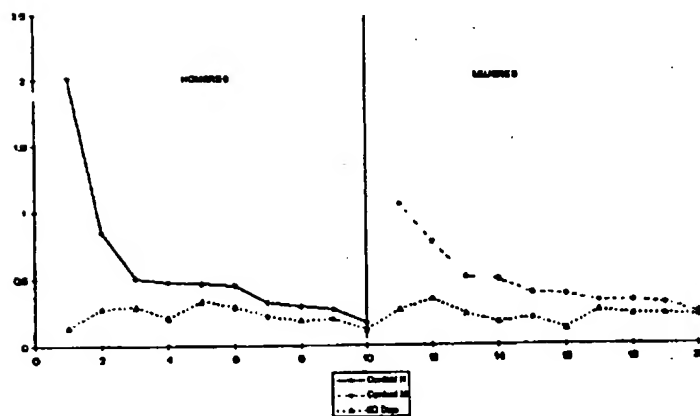


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 103 689

⑫ N.º solicitud: 9600556

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.03.96

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.º: A61K 35/78

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US-5266344-A (MIMURA et al.) 30.11.93 * Columnas 1,2; ejemplo 3 *	1
Y	BASE DE DATOS WPIL en QUESTEL, semana 9407, Londres: Derwent Publications Ltd., AN-94-053939, Class B05, JP-06009479-A (OKINAWA KEN KINOUSEI SHOKUHIN) * Resumen *	1
Y	FR-761734-A (A. BOERRIGTER) 26.03.34 * Página 2, líneas 11-44 *	1
Y	FR-2655054-A (PACIFIC CHEMICAL CO., LTD) 31.05.91 * Todo el documento *	1,3,8
Y	MIQUEL, J. et al. Effects of Turmeric on blood and liver lipoperoxide levels of mice: Lack of Toxicity. Age (Chester), 1995, Volumen 18, nº 4, páginas 171-174	1,3,8
Y	SRINIVAS, L. et al. Turmerin: A water soluble Antioxidant Peptide from turmeric (Curcuma longa). Archive of Biochemistry and Biophysics, Febrero 1992, Volumen 292, Nº 2, páginas 617-623	1,3
Y	US-5401504-A (DAS et al.) 28.03.95 * Columna 2 *	1,2
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 09.06.97	Examinador Asha Sukhwani	Página 1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 103 689

⑫ N.º solicitud: 9600556

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 07.03.96

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.º: A61K 35/78

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	DIXIT V.P. et al. Hypolipidaemic effects of Curcuma longa L. and Nardostachys jatamansi, DC in Triton-Induced Hyperlipidemic Rats. Indian Journal of Physiology and Pharmacology, Octubre-Diciembre 1988, volumen 32, nº 4, páginas 299-304	1,2
A	ES-8100878-A (PIERRE FABRE S.A.) 16.12.80	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 09.06.97	Examinador Asha Sukhwani	Página 2/2
--	-----------------------------	---------------

PTO 06-4325

CY=ES DATE=19970915 KIND=A1
PN=2 103 689

English Translation
of ES 2 103 689

NEW APPLICATIONS OF APOLAR AND POLAR EXTRACTS OF *Curcuma longa*
[NUEVAS APLICACIONES DE EXTRACTOS APOLARES Y POLARES DE *Curcuma longa*]

ELISEO QUINTANILLA ALMAGRO, ET AL.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. May 2006

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10):	ES
DOCUMENT NUMBER	(11):	2 103 689
DOCUMENT KIND	(12):	A1
PUBLICATION DATE	(41):	19970915
APPLICATION NUMBER	(21):	9600556
APPLICATION DATE	(22):	19960307
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	A61K 35/78
PRIORITY COUNTRY	(33):	NA
PRIORITY NUMBER	(31):	NA
PRIORITY DATE	(32):	NA
INVENTOR	(72):	Eliseo Quintanilla Almagro and Joaquin Diaz Alperi
APPLICANT	(71):	A.S.A.C. Pharmaceutical International A. I. E.
TITLE	(54):	NEW APPLICATIONS OF APOLAR AND POLAR EXTRACTS OF <i>Curcuma longa</i>
FOREIGN TITLE	[54A]:	NUEVAS APLICACIONES DE EXTRACTOS APOLARES Y POLARES DE <i>Curcuma</i> <i>longa</i>

NEW APPLICATIONS OF APOLAR AND POLAR EXTRACTS OF CURCUMA LONGA

Technical Field of the Invention

The present invention concerns the technical field of applications of extracts of *Curcuma longa* obtained by the method described in the main patent application No. P 9401737/9.

Prior Art of the Invention

Cutaneous aging is the set of physiological alterations in the skin connected with aging processes in general.

It is important to distinguish between intrinsic or physiological cutaneous aging, distinguishing features of which are: genetic determination, cellular, nuclear, mitochondrial, enzymatic alterations, etc., and extrinsic or actinic aging determined by nutritional, hormonal (menopause), toxic, and climatic factors (ultraviolet radiation). In both cases the consequences are the same "alterations of the structures and functions of the skin".

The biological bases of aging are due, on the one hand, to intrinsic genetic factors, in particular to nucleic acids; it is known that "life expectancy varies according to the species," although, on the other hand, so-called molecular errors in DNA transcription, seriously affecting protein synthesis, are involved. Defects in DNA repair induce a loss of physiological structures where metabolic errors participate in a specific way in the deviation of the biological program.

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

The cellular theory of cutaneous aging is based on the "in vitro" finding by Hayflick and Moorhead that human embryonic fibroblasts have a limited life in culture. The model of human fibroblasts can give us certain information concerning aging, since, depending on the duration of the culture, cell proliferation diminishes, and there are modifications within the extracellular matrices, in the cellular form and in its ultrastructure (rigid cytoskeleton, alterations in the DNA repair, and chromosome anomalies).

Recently, cultures of keratinocytes have made it possible to study "in vitro" modifications due to growth factors in skin coming from different donors (newborns, young adults, and elderly persons).

The current hypothesis is represented by the theory of free radicals, lipid superoxides, and the products of oxygen reduction, principally the superoxide anion. These peroxides can have an enzymatic origin, or be physiological products of the cellular metabolism of enzymatic products (influences of ultraviolet radiation). The progressive accumulation of these radicals, in part due to an antioxidant defect (disrupted superoxide), has multiple consequences: alterations of lipids, or of proteins, of (cytoplasmatic, lysosomal, mitochondrial) membranes, nucleic acid damage, depolymerization of proteins of the dermis, molecular aggregates and cross-linkings).

The following alterations that take place in the skin during the lifetime are known and are summarized below:

- In the epithelial tissue, epidermal atrophy (on the entire Malpighian layer) and alterations of the corneocytes and the intercellular spaces take place, causing modifications in the cutaneous surface relief. Anisocytosis, alterations in the basal cells, and modifications in the mucous layers and of the stratum granulosum are involved in actinic or extrinsic cutaneous aging. These facts have been revealed by means of "in vitro" investigation of the desquamation of the corneocytes and of the value of the index of proliferation of the epidermis.

These changes in the epithelial tissue directly affect the specific functions of the epidermis:

a) alterations in its hydration function: senile xerosis, a difficult term to define, the causes of which include, among other things, the lack of cohesion of the corneocytes due to their morphological alterations,

b) barrier function: modifications in absorption and increase in penetration,

c) susceptibility to the phenomena of irritation and sensitization,

d) decrease in the production of vitamin D, in part due to the /3 decrease in the 7-dehydrocholesterol content of the epidermis.

- A decrease in the number of melanocytes with a natural reduction of the effects of ultraviolet radiation (UV), or a hyperpigmentation due, in part, to the natural alterations of the melanosomes is observed in the pigmentary system during cutaneous

aging.

- The cells of Langerhans: natural cutaneous aging involves decreases responsible for aging of extrinsic origin: additional alterations, modifications in antigen expression, and in the production of cytokines (above all of interleukin I), facts that very significantly influence the processes of photocarcinogenesis and the local natural immunity of the skin.

- A fundamental dermoepidermal structural union where the dialog between epidermis and dermis established shows a progressive leveling during life due to the decrease in their thickness which is translated into an increase in cutaneous fragility.

- The dermis and its constituents: a decrease in the thickness of the dermis is observed, with alterations of the vascular tissue, difficulties in the proliferation of fibroblasts and in the production of extracellular matrices, biochemical variations in the collagen, disintegration of the microfibrils of the dermis, with deposits of calcium and lipids, an increase in the amorphous structure in the elastic fibers, and a decrease in the production of fibronectin.

- Sebaceous glands: increase in the size of the glands with a decrease in proliferation and reduction of sebum production, as well as a decrease in the hair follicles.

There are different systems for studying cutaneous aging: simple clinical observation (appearance of the skin, magnifying glass); histological and ultrastructural studies (epidermis, cells of Langerhans, melanocytes, dermoepidermal union, conjunctive tissue);

studies of the cutaneous relief (impressions); study of the cutaneous thickness (sonograph, cutaneous folds); biochemical studies (biology of the different systems); auto-radiography; cell cultures (fibroblasts, keratinocytes), etc.; human aging models (trisomy 21, progeria, acrogeria); and studies of the proliferation of keratinocytes after ultraviolet irradiation.

The cytoskeleton is the combination of cytoplasmatic microtubules and filaments that help the cell to maintain its architecture, preserve the cellular form, determine the position of the nucleus with the rest of the cell, and offer a framework for attachment and organization of structures that produce cytoplasmatic movements. However, there are intracellular controls capable of influencing cell shape and organization of the cytoplasm. The latter is composed of microtubules, actin microfilaments, and intermediary filaments. It is important to take account of the fact that a typical cell has a system of microfilaments, a system of microtubules, and a system of intermediary filaments, and not only one of the three.

The microtubules have a close relation with cellular motility. They are small cylinders 25 to 30 nm in diameter, have a circular structure made up of sub-units, and consist of microtubule-associated proteins (MAPs). The tubulins are specific constituents that have a molecular weight of 55 KD. They are arranged as support structures of the cytoskeleton.

The actin filaments form fine bundles that are in contact with the tonofilaments and with the desmosomes, most often displaying

filaments traditionally called "stress fibers". These fibers run parallel to the surface of the cell, however on some occasions they have a compact morphology located just below the plasmatic membrane, forming the classic filaments in the form of a crown. The actin is capable of fixing other proteins and its metabolism is intimately related to the calcium ions. The primordial function of the actin filaments is to provide a correct fixation and orientation of the cell when its movement begins.

The intermediate filaments of the keratinocytes are represented by the keratins, which are alpha-helicoidal fibrous proteins that form cytoplasmatic filaments by autoaggregation. They are located between the actin microfilaments and the microtubules. In vivo the keratins have a molecular weight between 46 and 70 KD. During the process of differentiation the distinct layers of the skin manifest different keratins, progressively observing the synthesis of keratohyalin and filagrin. Vimentin is the representative of the intermediate filaments present in the mesenchymatous cells (fibroblasts, endothelial cells, cells of the lymphohistiocyte line, chondrocytes, and also melanocytes). The vimentin filaments for a perinuclear location locate the nucleus in correct position within the cell; they maintain a close relation with the microtubules, although their principle function is static maintenance of the organelles. /4

Fibronectin belongs to the family of high molecular weight glycoproteins that very actively participate in the mechanisms that regulate the intercellular cell-matrix interactions. There are two

types of fibronectin: plasmatic fibronectin, synthesized by the hepatocytes and present in the blood, amniotic, articular, cerebral, and seminal fluid, and cellular fibronectin, which is located on the surface of the cells. Its principal characteristic is that of promoting adhesion by its association with the membrane, and the regulation of blood coagulation which may indicate to us that there is direct participation with the cytoskeleton. Collagen is another of the components that by their morphology also maintain a close relation with the intermediary filaments and the microtubules; there are different types of collagen; type I and III that together form small bundles of fibrils, type V that forms copolymers with type I, and type IV that forms the microfibrils and is a fundamental part of the dermoepidermal union. Laminin, one of the most studied molecules of the basal membrane, is a glycoprotein of 1000 KD; it is synthesized by the keratinocytes and the fibroblasts, making its appearance in the first month of fetal life. Laminin is capable of combining with the surface receptors of the cell surface (integrin), and of transmitting signals to the cytoskeleton, and in vitro promotes cell growth cells and participates in a very specific way in the adhesion mechanisms.

The chemical compounds existing in *Curcuma longa* rhizomes, and therefore in different extracts of the latter, have displayed an antioxidant, antiradical capacity, as the prior art indicates. These chemical compounds, curcumin and curcuminoids present in the extracts of *Curcuma longa*, have been used in the prophylaxis and treatment of different diseases and afflictions, in addition to being used in the

food industry as a preservative; in all of these case the experiments that are performed, are performed in vitro and do not demonstrate the atoxicity of the extracts, as was indicated for the patent application PCT/ES95/00097; however, of the studies collected by the applicant, the closest one to the present invention is the following: "SRINIVAS et al. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 292" in which the activity of turmeric is examined.

Turmerin, a protein present in the rhizomes of *Curcuma longa*, and easily isolated from these rhizomes by aqueous extraction, has shown a protective capacity with respect to the free radicals produced by ultraviolet radiation in DNA of calf thymus as well as an antioxidant capacity in human erythrocytes in vitro.

Detailed description of the invention

The present invention, as indicated in its declaration, refers to new applications of polar and apolar extracts of *Curcuma longa* obtained by the process described in the statement of the principal patent No. P-9401737/9, wherein it essentially includes the following operations:

(a) subjecting rhizomes of *Curcuma longa* to a continuous extraction process for some 48 hours, the *Curcuma* rhizomes having been previously cut, dried, and pulverized, using an organic solvent in a rhizome-solvent ratio of 1:7 weight/volume, carrying out the process in stationary conditions by means of regulating the temperature;

(b) filtering the extraction mixture resulting from step (a) and evaporating the solvent from the filtrate obtained at reduced

pressure, obtaining as a dry residue a brown oleoresin of characteristic color;

(c) dissolving the oleoresin resulting from step b) in hot ethyl acetate, in a proportion of approximately 50% w/w and then leaving the solution to cool to ambient temperature for approximately 24 hours, an orange-colored precipitate appearing, which is removed by filtration;

(d) drying at reduced pressure, the filtrate coming from the previous step in order to obtain a second, darker oleoresin than the previous one, the curcuminoid content of which varies between 20 and 25%;

(e) recrystallizing the precipitate resulting in approximately 50% (w/w) ethyl acetate, in order to obtain a solid with a curcuminoid purity greater than 90%;

and (II), the following operations are performed in order to obtain the polar extract of *Curcuma longa*:

(a') subjecting the previously cut, dried, and pulverized *Curcuma longa* rhizomes to an extraction process with water, keeping them in maceration for about 24 hours at a temperature between 50 and 70° C;

(b') filtering the extraction mixture resulting from step (a) /5 and evaporating the water from the filtrate thus obtained at reduced pressure in order to obtain a residue that is a hygroscopic solid corresponding to the polar extract of *Curcuma longa*;

and (III), it is also possible to carry out the extractions by means of the supercritical extraction technique using a CO₂ flow containing approximately 5% ethanol at a pressure of approximately 260 bar in

order to obtain the corresponding apolar extract with a curcuminoid purity of 90%, or using water as a co-solvent in the same conditions in order to obtain the polar extract.

Because of the importance that the cytoskeleton has within the normal physiology of the cell, the present invention makes use of the effect of extracts of *Curcuma longa* on cell proliferation, the cytoskeleton (microtubules, actin microfilaments, and intermediary filaments), the expression of fibronectin, laminin, and collagen in cultures of keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts coming from donors of different ages and in successive passages, as well as the effect on keratinocyte proliferation after irradiation with ultraviolet light A/B as indicators of the protective capacity of *Curcuma longa* extracts.

On the other hand, free oxygen radicals probably play an important role not only in the aging process, but also in some degenerative syndromes connected with this process. In particular, the idea that atherogenesis (which gives rise to arterosclerosis and other cardiovascular processes) results from the action of the lipid peroxides formed in the blood that wound the endothelium and provoke an inflammatory process in the arterial wall is gaining acceptance. This result is in agreement with the investigations that reveal an accumulation of lipid peroxides in arteriosclerotic plates, parallel in intensity to that of the process of vascular degeneration. This concept is in agreement with the data that show an elevation in the blood level of lipid peroxides and in the plasma of patients who are

recovering from myocardial infarct or pectoral angina and persons with other atherosclerotic risk factors, such as tobacco smoking, stress, diastolic hypertension, and advanced age. These data again suggest that lipid peroxides are related to the pathogenesis of arteriosclerosis. The mechanisms would be:

- a) alteration of the lipoproteins-lipases of the coronary vessels, with the following changes in the metabolism of cholesterol and triglycerides,
- b) formation of clots, because of an inhibition of prostacyclin synthesis,
- c) oxidation of plasmatic lipoproteins, especially those of low density.

Oxidation of the low-density plasmatic lipoproteins appears to be of great importance for the pathogenesis of atherosclerosis, since oxidized LDL's have a greater charge than native LDL's and therefore lead to an accumulation of cholesterol ester in human nanocytes and macrophages, thus increasing the atherogenetic potential of these cells.

The present invention develops a new application of *Curcuma longa* extracts, as modulators of oxidized high- and low-density lipoproteins (HDL and LDL).

The fundamental difference between the present invention and the above-mentioned work of Srinavas (1992) is based on the substrate studied.

The present invention experimentally demonstrates the protective capacity of the aqueous extract of *Curcuma longa* in the cutaneous tissue, the first defense of the organism against external attacks, such as from free radicals.

The studies discussed below demonstrate that it is not possible to correlate the antioxidant capacity of the extracts with the protecting capacity of the extract in human cells, since the curcumoids have a known antioxidant nature and trap free radicals, however they do not have a keratinocyte-protecting effect as does the aqueous extract of *Curcumin longa*.

The protective activity of the aqueous extract of *Curcuma longa* has been demonstrated using a model of cell proliferation and a morphological mode in human beings that is much more representative than the tests of antioxidizing capacity in vitro or in animals.

The reducing capacity of the levels of oxidized high- and low-density lipoproteins HDL and LDL is demonstrated; this contributes one more piece of information with respect to the use of extracts of *Curcuma longa* as an arteriosclerosis-preventive agents, as was cited /6 in the patent application PCT/ES95/0097.

Brief description of the figures

Fig. 1. Is a representative graph of the LDL peroxide levels.

Fig. 2 is a representative graph of the HDL peroxide levels.

Embodiments of the invention

The present invention is justified experimentally with the following studies and analysis made in a non-limiting way and not

limiting the scope of the present invention.

1. *Effect of different extracts of Curcuma longa on the proliferation of human keratinocytes after ultraviolet A/B radiation*

1.1 *Extracts used*

The extracts used in the present study were obtained by extraction by maceration of ground rhizomes of *Curcuma longa* for 24 hours, subsequent elimination of the solvent at reduced pressure and at 50°C, and then lyophilization of the samples. The rhizome/solvent ratio used was 1/10. The curcuminoid and protein nitrogen content were determined by the Pierce method; the different extracts are detailed below.

extract	solvent	% curcuminoids	proteins
1	ethanol	23%	0%
2	ethanol/water(1/1)	8%	21 %
3	water	0%	31%
4*	ethanol-water	11%	16%
5*	water-ethanol	13%	20%

*It is extracted primarily with the first solvent and the residue is extracted again with the second solvent indicated.

1.2 *Cellular cultures*

The line of normal human keratinocytes called HaCat (human adult low calcium high temperature), which was kindly provided to the applicant by Prof. Fuesenig (German Cancer Research Center, Heidelberg), was used in this study. This line has a differentiation potential exactly equal to normal keratinocytes.

The cells were cultured in Hanks medium with 5% bovine fetal serum and 1% penicillin / streptomycin and they were held in an oven

at 37° with a 5% CO₂ atmosphere.

The culture medium was changed two times a week. The growth was monitored by means of an inverted microscope.

1.3 Cell proliferation

5-bromo-2-desoxyuridine (BrdU) (Cell Proliferation ELISA-Kit, Boehringer, Mannheim) was incorporated in the cultures in order to measure the cell proliferation. For this technique from 5 to 7 x 10³ cells/ cup were incorporated on one multiplate; after 24 hours different concentrations of *Curcuma longa* extracts (0, 1, 5, 10, 50, and 100 mg/ml) were added to the medium. The cells were irradiated with UVA/B; after the irradiation the plates were washed with PBS and the BrdU was incorporated, which was measured spectrophotometrically with a 450 nm filter.

1.4. Ultraviolet radiation

The cells were irradiated with a Psoriflux 3050 A lamp (original Hanau, Hanau, Germany) with different doses: 50, 100, and 2300 mJ/cm². The lamp did not emit any significant UVC spectrum.

1.5. Results

The cells were incubated with 5 different *Curcuma longa* extracts; these cells were irradiated with different intensities of UVA/B, then the cell proliferation was measured.

Control cells (medium without extract)

/7

The cells in a medium without extract reacted to the UV irradiation with a dosage-dependent degree of proliferation.

Extract 1

In a state without irradiation in control cultures, the cells indicated an inhibition of cell proliferation at a concentration of 50 mg/ml, taking account of the above; at 100 µg/ml there is no cell proliferation; After the irradiation with UVA-B the cells reacted more sensitively to the extract, because the inhibition of the proliferation of the cells already had lower concentrations of the extract than 5 mg/ml. With an intensity of irradiation of 100-200 mJ, the inhibition of cell proliferation was more intense.

Extract 2

Non-irradiated cells demonstrated an inhibition of the proliferation from 50 mg/ml; also it was possible to observe a more intense reaction in the cells after the irradiation. This inhibition was observed already from a concentration of 5 mg/ml of medium; the inhibition was stronger with irradiation intensities of 100-200 mJ.

Extract 3

This extract did not display any reaction on the proliferation of the cells. The DNA synthesis was the same in all the concentrations used. UV radiation never could sensitize the cells for this extract. Even after irradiating the cells, changes could not be observed in cell proliferation.

Extract 4

A decrease of cell proliferation from 50 mg/ml in non-irradiated cells also could not be seen here. After irradiating them, they displayed a stronger reaction to the decrease in proliferation.

Extract 5

A more significant inhibition was noted from a concentration of 5 mg/ml in non-irradiated cells, but after irradiating the cells, the same sensitivity as with extracts 1, 2, and 4 was noted. The cells already reacted from a concentration lower than 5 mg/ml with a decrease in proliferation.

1.6 Conclusions

The aqueous extract of *Curcuma longa* displays a protective action in human keratinocytes in vitro against the free radicals generated by ultraviolet radiation at all concentrations and all doses.

Therefore the antiradical activity in human keratinocytes is not in the curcuminoids but in the protein extract of the extract.

2. Effects of the aqueous extract of *Curcuma longa* on the cytoskeleton of human keratinocytes in vitro

2.1 Obtaining the skin

Healthy skin coming from surgical patients in the Surgical Services of Plastic Surgery, Dermatology, Urology, and Gynecology is used. The relation is the following:

type of operation	average age	cases
Scraping. Fetal skin	18 weeks	4
circumcision	3 years	12
mammary reduction	31 years	7
abdominoplasty	53 years	9
skin biopsies	73 years	14

2.2 Keratinocyte cultures

The skin is transported to the laboratory in sterile conditions, submerged in Hank's liquid (Gibco) supplemented with 10% bovine fetal serum (Seromed) and 1% of penicillin / streptomycin (Gibco).

Different washings with buffered phosphate solution were carried out; the skin was subjected to the action of trypsin (0.25% concentration (Boehringer, Mannheim), for two hours at 37°C or to the action of Diapase II (only in fetal skin) (Boehringer, Mannheim) for /8 the entire night at 4°C.

After this period dermoepidermal separation was performed and, once the cellular suspension of keratinocytes was obtained, the latter were introduced into 25 cm² culture flasks (NUNC) with the appropriate medium for keratinocytes.

2.3 Culture media

- Keratinocyte-SFM basal medium (Gibco)
- Bovine pituitary extract (50 g/ml, Gibco)
- recombinant epidermal growth factor (5 ng/ml, Gibco)
- 1% penicillin /streptomycin (Gibco).

The medium was changed three times a week. After 15 days of culture the first passage was made using very low concentrations of trypsin and EDTA (0.025/0.01 %) respectively.

2.4 Incorporation of the extract

A concentration of 5 mg/ml of aqueous extract of *Curcuma longa* was introduced into culture flasks of confluent cells coming from the skin of 3 year old and 68-80 year old patients. These cultures are

held with the extract 48 hours after which the medium is changed and fresh extract is added again.

The cytoskeleton was studied after four days of contact with the aqueous extract of *Curcuma longa*.

2.5. *Study of the cytoskeleton*

2.5.1 *Antibodies used*

2.5.1.1. *Keratinocytes*

- phalloidin, TRITC, actin (dilution 1/10) (Merck)
- anti-tubulin (dilution 1/20) (Sera-lab)
- KL basal layer 1-anti-keratinocytes (dilution 1/20) (Immunotech)
- human keratin (dilution 1/50) (Sanbio)
- monoclonal mouse-anti-laminin (dilution 1/20) (Sigma)
- anti-human fibronectin (dilution 1/50) (Sigma)
- anti-human desmoplakin (dilution 1/20) (Sigma)

2.5.2 - *Techniques for use of antibodies*

2.5.2.1 - *Special fixation for the antibodies used*

- actin: formaldehyde, 25 minutes at ambient temperature
- tubulin: methanol, 10 minutes at -20°C
- KLI, Pan-keratins, desmoplakin: acetone / methanol, 10 minutes at 4°C
- fibronectin: acetone, 20 minutes at -20°C.

2.5.2.2 - *Indirect immunofluorescence*

After fixation the cells are washed in a phosphate buffered solution (PBS) (Flow Lab), adding 1% of BSA. Then they are covered

with the antibody to be studied and incubated for 2 hours at 37°C. Various washings with PBS+1% and the conjugate marked with fluorescence or rhodamin diluted in PBS+1% of bovine fetal serum are performed.

2.5.2.3 - *Synchronization of the cells and investigation of cell proliferation by means of BrdU incorporation*

After carrying out the investigation of proliferation by means of BrdU incorporation, the cells were synchronized with the following protocol:

For three days the cells were cultured with the appropriate measures, but only 0.4% bovine fetal serum was added in all the cultures of the invention, whether keratinocytes, fibroblasts, or melanocytes; on the following day the cells were held with the complete medium and the BrdU was incorporated.

The BrdU (concentration 10µM) was incorporated for 30 minutes for the keratinocytes and fibroblasts and for 2 hours in the melanocyte cultures. The cells were washed with PBS+1% glucose and fixation was performed by means of 70% ethanol in PBS for 30 minutes at 0°C. Then, in order to denature the DNA, the cells were treated for 30 minutes with 2N HCl at ambient temperature, the effect of the HCl being rapidly blocked by means of sodium tetraborate (0.1 M, pH 8.5). The cells were incubated for 30 minutes with anti-BrdU (dilution 1/10 in PBS +0.5% Tween 20+1-% BSA). After various washings the cells /9 were developed with goat anti-mouse IgG (FITC) (dilution 1/20). We counted the positive BrdU cells, the interpretation of which is given in

%;

2.6 Results

2.6.1 Keratinocyte culture

2.6.1.1. Time of confluence and number of passages

age	culture	primary number of passages	differentiation signs
fetal (4 weeks)	10 days	4*	from the 3 rd passage
neonatal (30 days)	10 days	4*	from the 3 rd passage
4-9 years	13 days	3	from the 3 rd passage
18-31 years	17 days	3	from the 2 nd passage
45-60 years	19 days	2	from the 2 nd passage
80 years	21 days	1**	from the 1 st passage

* p = 0.05

**p = 0.01

2.6.1.3 Investigation of the cytoskeleton

age	neonatal	60-70 years old	60-70 years old + Curcuma
C.P. actin	+++	+	+++
U. P.	+++	+	+++
C.P. tubulin	+++	++	+++
U. P.	++	-	++
C.P. ker. Basal	++	++	+++
U.P.	+	-	+
C.P. ker. Total	++	++	+++
U.P.	++	+	+++
C.P. ker. 1-10	-	+++	+
U.P.	-	++	-
C.P. fibronectin	+++	+	+++
U.P.	+	-	+
C.P. desmoplakin.	+++	+	+++
U.P.	+++	-	++
BrdU	80%	20%	65%

+ weak marking

++ moderate marking

+++ intense marking

*p = 0.001

C.P. = primary culture

U.P. = last passage

Actin microfilaments are present in all the cultures made, /10
although its expression is less intense in embryonic keratinocytes and
in adults (adults 80 years old). The distribution pattern was not
exactly equal since in the embryonic keratinocytes they exhibited
actin with the typical morphology of stress filaments, this
arrangement of the actin was constant and of more intense marking in
the keratinocytes up to 31 years old; then the more adult
keratinocytes presented the microfilaments just below the
cytoplasmatic membrane, losing the typical striation.

The microtubules displayed intense marking of the same in
embryonic and young adult cultures; and it was typical to observe
multiple formations of mitotic spindles of an abnormal nature in the
cells, since these spindles were formed by the union of other cells.
In the adult cultures we observed a correct arrangement of
microtubules, accumulating especially below the cytoplasmatic membrane
the same as actin filaments, and finding few spindle formations.

The 56.5 KD (basal keratin, KLI) keratin, was present only in the
primary cultures and with moderate intensity in the embryonic
keratinocytes and keratinocytes coming from infant skin; this keratin
displayed a compact cytoplasmatic pattern. The presence of basal
keratin was observed in the last passages in the cultures of adult
keratinocytes. The total keratins were always present both in the
primary culture and in the last passages, the pattern of this keratin
was not compact, it is distributed in fibrillar form throughout the
cytoplasm of the cell, establishing connections with the desmosomes.

The keratin 1-10 representing the differentiated intermediary filaments was totally negative in the primary cultures coming from fetal and infant skin; however, in the last passages it was weakly manifested, while in adults the marking of this keratin was very intense, showing wide filaments of parallel arrangement in the cytoplasm.

Laminin was already present in the primary cultures although demonstrating a weak marking; only in the last passages did the neonatal and embryonic keratinocytes contain small fibrils. The fibronectin was intensely positive in the young primary cultures forming bundles of microfibrils in the periphery of the cytoplasm, being practically negative in the last passages.

In the investigation of the desmoplakin, it was possible to observe only an intense marking in the young keratinocytes. After the successive passages, the adult keratinocytes demonstrated only a weak marking.

The investigation of the proliferation by means of the incorporation of the BrdU demonstrated, there is a significant difference between the cultures of embryonic cells and cells of 80-year old adults, while the others demonstrated certain variations, the studies not being statistically significant.

When the aqueous extract of *Curcuma longa* is added to the cultures, the following is observed:

- There is a restructuring of the cytoskeleton that is demonstrated by the appearance of a mosaic pattern, or by using the

keratinocytes coming from the skin of persons over 60 years old, when in reality in the controls this morphology remained only in cultures of cells from persons up to 20 years old.

- In the cultures of cells coming from prepuces of 3-year olds, there is an intense expression of the proliferation keratins, this situation disappears when the culture comes from adult cells: upon adding *Curcuma longa* the expression of this keratin reappears again in adult keratinocytes; the same occurred with the anti-pankeratin and anti-tubulin antibody.

- The expression of the desmoplakin and the fibronectin was very strong when the aqueous extract of *Curcuma longa* is added in the cultures coming from adult skin.

- The actin presented the typical image of stress filaments in all the cultures of additional adult cells with aqueous extract of *Curcuma longa*.

2.7 Conclusions

The aqueous extract of *Curcuma longa* increases the cell proliferation in cultures of tissues from aged human beings.

The aqueous extract of *Curcuma longa* produces a physiological structuring in the keratins of skin keratinocytes in cultures of tissues from aged human beings.

The aqueous extract produces an increase in the desmosomes in cultures from aged human beings comparable to the results "in vivo."

The aqueous extract of *Curcuma longa* restructures the cytoskeleton of human keratinocytes in a culture coming from adult

skin and different passages.

The aqueous extract of *Curcuma longa* possesses a protective capacity against aging processes. /11

3. Effect of tablets of extracts of *Curcuma longa* in oxidized lipoproteins

Tablets of extract of *Curcuma longa*, the composition of which is as follows, were administered orally:

	mg/tablet
apolar extract of <i>Curcuma longa</i> *	60
polar extract of <i>Curcuma longa</i> **	175
excipients csp	

* Equivalent to 12.5 mg of *Curcuma longa*

** Equivalent to 50 mg of proteins

to times a day to 20 healthy volunteers (10 men and 10 women), between 40 and 72 years old (average: 55.7 years old, standard deviation: 9.1 years).

Blood was taken from the volunteers at the beginning of the treatment, at 30 days, and at 60 days.

The blood samples were obtained from the cubital vein, and used for a routine cytological evaluation (using a Technician H1 analyzer), carrying out the analysis of the biochemical parameters using Boehringer, Mannheim reagents and standard methods of (using an Hitachi 717 autoanalyzer), In addition, a cytochemical evaluation of the liver (determining the plasmatic levels of the gamma glutamin transferase [GGT], glutamic oxalacetic transferase [GOT], glutaminic pyruvic transferase [GPT], alkaline phosphatase, and bilirubin) and the renal function (evaluating the plasmatic levels of urea and

creatinin), and a determination of the levels of peroxides of lipoproteins according to the thiobarbituric acid method were carried out. The cholesterol level also was determined.

3.1 Results and discussion

The treatment was well tolerated, and none of the individuals had to leave the study because of any side effect. With respect to the results of the blood analyses, significant variations do not appear in the cell counts or in the standard biochemical parameters. In addition, the fact that the levels of the hepatic enzymes never vary suggests that the treatment is not hepatotoxic.

The cholesterol level did not suffer statistically significant variations because both men and women participating in the study presented a decrease in the levels of HDL and LDL peroxidized at 30 days of treatment, the latter being more generalized at the end of 60 days, the final values of peroxidation falling between 20% and 50% of the initial value. It is interesting to note that the values do not fall to a zero level, but values analogous to those of the individuals with a low level of peroxidations were reached, which on the other hand did not reflect important variations.

3.2 Conclusions

The extract of *Curcuma longa* reduces the level of the high- and low-density oxidized lipoproteins up to a threshold value analogous to the individuals with a low level of peroxidation.

1. Application of extracts of *Curcuma longa*, obtained by the process described in the main patent application No. P-9401737/9, to the production of compositions and preparations for reducing the level of oxidized high- and low-density lipoproteins up to a threshold value analogous to the individuals having a low level of peroxidation.

2. The application of extracts of *Curcuma longa*, according to Claim 1, in the production of compositions and preparations modulating oxidized high- and low-density lipoproteins (HDL and LDL).

3. The application of extracts of *Curcuma longa* obtained by the procedure described in the principal patent application No. P-9401737/9, in the production of compositions and preparations for in vitro protection of keratinocytes against the free radicals generated by ultraviolet radiation.

4. The application of extracts of *Curcuma longa* obtained by the procedure described in the principal patent application No. P-9401737/9 for producing compositions for increasing cell proliferation in cultures of tissues from aged human beings.

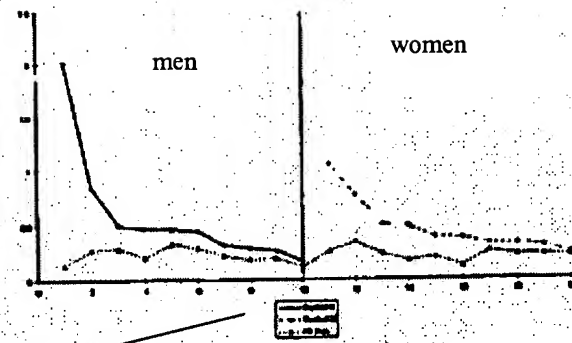
5. The application of extracts of *Curcuma longa* obtained by the procedure described in the principal patent application No. P-9401737/9, for producing compositions and preparations for physiologically structuring the keratins of the keratinocytes of the skin in cultures of tissues from aged human beings.

6. The application of extracts of *Curcuma longa* obtained by the procedure described in the principal patent application No. P-

9401737/9 for producing compositions and preparations for increasing the desmosomes in cultures from aged human beings.

7. The application of extracts of *Curcuma longa* obtained by the procedure described in the principal patent application No. P-9401737/9 for producing compositions and preparations for restructuring the cytoskeleton of human keratinocytes in cultures coming from adult skin.

8. The application of extracts of *Curcuma longa* obtained by the procedure described in the principal patent application No. P-9401737/9 for producing compositions and preparations for protecting human beings against aging processes.



control men
control women
[illegible]

FIG. 1

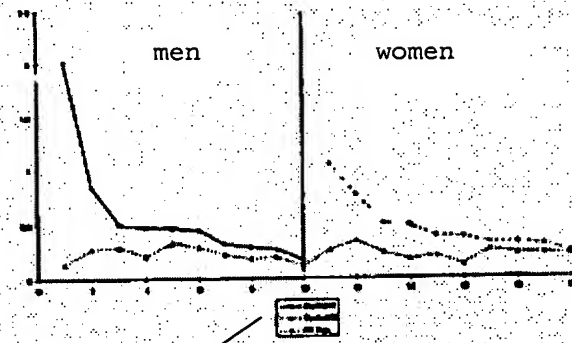


FIG. 2

control men
control women
[illegible]